

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

INPI
INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

REC'D 25 OCT 1999
WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

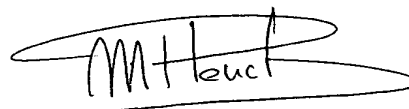
~~CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION~~

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 13 OCT. 1999

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets



Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES 15.10.98
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 9812957
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 75
DATE DE DÉPÔT 15 OCT. 1998

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET REGIMBEAU
26, Avenue Kléber
75116 PARIS

n° du pouvoir permanent 237389 D17757 JW références du correspondant 01 45 00 92 02
téléphone

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

demande initiale

☐ brevet d'invention ☐ certificat d'utilité - n° date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance ☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Sondes fluorescentes de peinture chromosomique

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination
GENSET

Forme juridique
SOCIÉTÉ ANONYME

Nationalité (s) Française

Adresse (s) complète (s)

24, rue Royale, 75008 PARIS

Pays

FR

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs ☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES ☐ redevance pour la 1ère fois ☐ redevance antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

[Signature]
am253

[Signature]

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

7812957

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

TITRE DE L'INVENTION : **Sondes fluorescentes de peinture chromosomique**

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

GENSET
24, rue Royale, 75008 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

CHERIF Dorra
11, rue Raymond Losserand
75014 Paris, FR

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

15 octobre 1998

[Signature]
amss

CABINET REGIMBEAU

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDECATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
9, 21 & 26			α	10.03.99	19 MAI 1999 - SR

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

SONDES FLUORESCENTES DE PEINTURE CHROMOSOMIQUE

La présente invention concerne la peinture chromosomique et plus particulièrement les sondes fluorescentes utilisables dans des méthodes telles que la
5 méthode FISH ("Fluorescence *In Situ* Hybridization").

L'hybridation *in situ* est une technique permettant de repérer une séquence d'ADN (ou d'ARN) au moyen d'une sonde de séquence spécifique homologue à celle étudiée. Elle est fondée sur la complémentarité des nucléotides (A/T, A/U, G/C), elle peut être réalisée en conditions physicochimiques précises sur des préparations
10 chromosomiques ou tissulaires. Le résultat du processus d'hybridation *in situ* est la formation d'un hybride entre une sonde et une cible. L'hybridation *in situ* inclut une étape de dénaturation et également une étape de détection de l'hybride ou de la sonde qui est réalisée après l'hybridation *in situ* de la sonde sur la cible. L'échantillon peut adhérer sous forme de couche à la surface de la lame et l'échantillon peut, par exemple,
15 comprendre ou contenir des chromosomes individuels ou des régions chromosomiques qui ont été traités pour maintenir leur morphologies sous, par exemple, des conditions de dénaturation. Dans le cadre de l'hybridation fluorescente *in situ*, les sondes sont marquées avec un fluorophore et l'hybridation est révélée par un marquage fluorescent.

Le développement récent de cette technique permet la visualisation
20 simultanée, sur la même préparation, de plusieurs sondes révélées chacune par un fluorophore différent. Cette technique dénommée FISH-multicouleur ou multi-FISH a été rendue possible par la combinaison de filtres spécifiques des longueurs d'onde d'émission des différentes molécules fluorescentes assurant le marquage grâce à une imagerie assistée par ordinateur réalisée au moyen de caméras CCD refroidies de haute
25 résolution sensibles dans l'infrarouge (Schröck et al., 1996 ; Speicher et al., 1996).

L'utilisation de sondes présentant une séquence spécifique homologue à une séquence chromosomique précise ou un chromosome entier couplé aux potentialités d'un marquage fluorescent multicouleur permet de développer des techniques dites de peinture chromosomique, c'est-à-dire d'obtenir des chromosomes
30 de différentes couleurs et ainsi d'obtenir, si cela est souhaité, un caryotype complet multicouleur. On entend par caryotype, l'arrangement caractéristique des chromosomes d'une cellule à la métaphase.

Au sens général du terme, on entend par "marquage" une entité telle qu'un isotope radioactif ou une entité non isotopique telle que des enzymes, la biotine,
35 l'avidine, la streptavidine, la digoxygénine, les agents luminescents, les colorants, les

haptènes et autres. Les agents luminescents, selon la source d'énergie d'excitation, peuvent être classés en radioluminescents, chémiluminescents, bioluminescents et photo-luminescents (incluant fluorescents et phosphorescents). Le terme "fluorescent" se réfère en général à la propriété d'une substance (telle un fluorophore) de produire de la lumière lorsqu'elle est excitée par une source énergétique telle que la lumière ultra-violette par exemple.

On entend par "sonde de peinture chromosomique" une sonde ou à une composition de sondes telle la composition de sondes de cette invention, qui est adaptée pour hybrider, sous les conditions d'hybridation, avec une cible qui comprend un chromosome prédéterminé d'un génome multi-chromosomique. Si seulement une fraction d'un tel chromosome est présente dans l'échantillon subissant une telle hybridation avec une telle composition de sondes, alors cette fraction s'hybride et est identifiée. En pratique, une sonde peinte de cette invention peut être mélangée avec une seconde, une troisième, etc. pour permettre le marquage et la détection simultanés des deux, des trois, etc. chromosomes prédéterminés.

La visualisation de l'ensemble des 24 chromosomes humains a été rendue possible par l'utilisation d'un marquage combinatoire de fluorochromes. Par exemple, dans le cas de l'utilisation de 5 fluorophores différents, une combinaison de 31 fluorophores peut être obtenue. En utilisant ce principe de marquage et 24 sondes d'ADN spécifiques de chacun des chromosomes humains, il a été possible de visualiser chaque chromosome de façon différentielle. L'attribution, par le traitement informatique, de couleurs artificielles à chacune des combinaisons de fluorophores permet ainsi de colorer différemment les 24 chromosomes humains.

Rapidement, les fortes potentialités d'un tel marquage multicolore ont permis l'analyse d'aberrations chromosomiques jusqu'alors difficilement détectables par les techniques cytogénétiques classiques de marquage des chromosomes en bandes (Summer et al., 1971 ; Dutrillaux et Lejeune, 1971) (coloration au Giemsa, marquage au BrdU, etc.). Le principe de marquage des chromosomes en bandes repose sur les différences dans la composition moyenne en paires de base (richesse en GC) entre les bandes et sur les différences de compaction de la chromatine entre les bandes chromosomiques. La peinture chromosomique s'avère être un outil très utile pour détecter les aberrations interchromosomiques telles que les translocations, les séquences d'ADN amplifiées telles les régions colorées de façon homogène appelées HSR (HSR pour Homogeneously Staining Regions) ou les excès de matériels chromosomiques tels que les chromosomes marqueurs ou des chromosomes double-

minute. Les aberrations intrachromosomiques telles que les délétions et duplications ne seront détectées qu'en fonction de la taille des aberrations, si celles-ci affectent la longueur des chromosomes, alors que les inversions chromosomiques ne seront pas du tout détectables par cette méthode.

5 Les limites d'utilisation du caryotypage spectral actuel en tant que tel sont dues au fait qu'il ne permet pas de détecter la nature des bandes chromosomiques impliquées dans un remaniement, inter- ou intrachromosomique. Pour ce faire, il est indispensable de coupler cette technique à celle plus conventionnelle des bandes chromosomiques (marquage R ou G) telle la contre-coloration au DAPI, la coloration
10 au Giemsa ou à l'iodure de propidium par exemple.

L'obligation de combiner différentes techniques constitue bien entendu un handicap dans l'analyse des aberrations chromosomiques et, par ailleurs, l'utilisation de la méthode FISH ou multi-FISH qui associe le prix élevé de l'appareillage et de l'instrumentation nécessaire à la visualisation de la peinture chromosomique au prix
15 élevé des sondes spécifiques des chromosomes restreint les possibilités de diffusion de cette technique auprès des laboratoires de recherche ou des laboratoires de diagnostic.

Des sondes de peinture actuellement disponibles sur le marché (GIBCO-BRL, Oncor, Boehringer Mannheim et autres) sont obtenues par amplification DOP-PCR utilisant des amorces PCR dégénérées de chromosomes ou de fragments de
20 chromosomes isolés par des techniques lourdes telle le tri chromosomique par cytométrie de flux ou la microdissection de chromosomes. Certains auteurs ont décrit l'utilisation de sondes de peinture chromosomique obtenue par amplification de chromosomes par IRS-PCR (Interspersed Repeated Sequences) utilisant des amorces spécifiques des séquences d'ADN répétées et dispersées dans le génome comme les
25 séquences Alu et LINE. L'hybridation de sondes obtenues par DOP-PCR ne génère pas de bandes chromosomiques sur les chromosomes. L'utilisation combinée d'amorces PCR LINE et Alu pour l'amplification de chromosomes humains par IRS-PCR telle que décrite dans la présente invention a été proposée au préalable par Lichter et al., 1990 ; néanmoins, le marquage en bandes R obtenu par ces derniers ne permet pas
30 d'assurer une peinture complète couvrant toutes les régions du génome, notamment les régions télomériques et certaines bandes chromosomiques G.

La présente invention a pour objet de fournir des sondes chromosomiques qui peuvent être obtenues de façon peu onéreuse et qui en outre permettent de faire apparaître directement les bandes chromosomiques de qualité sur les chromosomes
35 peints dans leur totalité.

Pour ce faire, la présente invention concerne des sondes destinées au marquage d'un chromosome, caractérisées en ce qu'elles sont composées d'un ensemble de segments d'ADN davantage représentés dans certaines bandes chromosomiques et sont obtenues par amplification IRS-PCR à partir desdits
5 chromosomes, les segments d'ADN étant et amplifiés à partir d'amorces spécifiques des séquences d'ADN Alu et LINE.

Le terme "sonde" se réfère à un polynucléotide, ou une mixture de polynucléotides tels que des segments d'ADN ou des séquences d'ADN, associés chimiquement à des entités individuelles marquées. Chacun des polynucléotides
10 composant une sonde est de manière caractéristique sous forme simple brin au moment de l'hybridation sur la cible.

Le terme "fragment d'ADN", "segment d'ADN" indique généralement seulement une portion d'un polynucléotide d'ADN ou d'une séquence présente dans un chromosome ou une portion de chromosome. Un polynucléotide par exemple peut être
15 coupé ou fragmenté en une multitude de segments ou de fragments. Un chromosome contient de manière caractéristique des régions qui ont des séquences d'ADN contenant des segments d'ADN répétés. Le terme "répété" se réfère au fait qu'un segment d'ADN particulier est présent de nombreuses fois (au moins deux fois) de manière dispersée ou non dans le génome. La méthode dite IRS-PCR utilise des amorces dans les
20 séquences répétées dispersées du génome, comme les séquences Alu ou LINE par exemple.

On désigne par "génome" la copie complète et unique des instructions génétiques d'un organisme codées par l'ADN de cet organisme. Dans la présente invention, le génome particulier considéré est multichromosomique de telle sorte que
25 l'ADN est distribué dans la cellule entre plusieurs chromosomes individuels ; le génome humain se compose de 23 paires de chromosomes dont une paire XX ou XY déterminant le genre.

Le terme "chromosome" se réfère au support des gènes porteurs de l'hérédité dans une cellule vivante qui dérive de la chromatine et qui comprend de
30 l'ADN et des composants protéiques (essentiellement les histones). le système conventionnel international d'identification et de numérotation des chromosomes du génome humain est employé ici. La taille d'un chromosome individuel peut varier de l'un à l'autre dans un génome multi-chromosomique et d'un génome à l'autre. Dans le cas présent du génome humain, la longueur totale d'ADN d'un chromosome donné est

généralement supérieure à 50 000 000 pb. Par exemple, la longueur totale du génome humain est de 3.10^9 pb.

Le génome des mammifères contient des séquences répétées d'ADN dispersées sur tout le génome. Chez l'homme, la majeure partie de ce type de séquences est représentée par les différentes familles de séquences Alu, qui sont au nombre de 10^6 environ, et ont en commun une séquence consensus de 300 pb. Les séquences répétées LINES (ou L1) sont, comme les séquences Alu, largement distribuées sur tout le génome. Elles sont cependant moins nombreuses (environ 10^4), leur séquence consensus est d'environ 6 kb, et elles sont préférentiellement situées dans les bandes sombres G (G positives ou R négatives), alors que les séquences Alu sont plutôt situées dans les bandes sombres R (R positives) (Korenberg et Kirowski, 1988).

Dans le cadre de la présente invention, les segments d'ADN amplifiés par IRS-PCR ont pour source des hybrides somatiques rongeur-homme monochromosomiques et sont davantage représentés dans un type de bandes cytogénétiques, de préférences les bandes R.

En effet, des séquences répétées, analogues aux séquences répétées humaines, sont aussi retrouvées dans le génome des rongeurs. Toutefois la divergence de ce type de séquences entre homme et rongeur est suffisamment importante pour qu'il y ait peu d'homologie entre elles. Ainsi en partant de l'ADN d'un hybride somatique homme-rongeur et en utilisant des amorces spécifiques de la séquence consensus Alu et/ou L1, on peut amplifier sélectivement par PCR les séquences d'ADN comprises entre deux séquences répétées (en position "tête-bêche") séparées par une distance < 5 kb. Le produit d'amplification ainsi obtenu est constitué d'un ensemble de fragments (dont la taille varie environ de 100 pb à 5 kb) représentatif de la quasi totalité du chromosome humain contenu dans l'ADN de l'hybride somatique.

De façon générale, la présente invention est bien entendu plus particulièrement destinée à réaliser des sondes spécifiques de chromosomes humains, même s'il est possible d'envisager des peintures chromosomiques pour d'autres types cellulaires (Sabile et al., 1997).

De préférence, les amorces spécifiques des séquences d'ADN Alu sont constituées par l'amorce SR1 dont la structure figure dans l'identificateur de séquence n° 1 et l'amorce spécifique de la séquence d'ADN LINE est de préférence l'amorce L1H dont la séquence figure dans l'identificateur de séquence n° 2 et dans l'identificateur de séquence n° 3.

- Les sondes de la présente invention sont caractérisées en ce que les sondes sont issues d'un mélange de deux produits d'amplification IRS-PCR composé de :
 - produit d'amplification PCR obtenu par l'utilisation de l'amorce spécifique des séquences d'ADN Alu,
 - 5 - produit d'amplification PCR obtenu par l'utilisation de l'amorce spécifique des séquences d'ADN Alu et de l'amorce spécifique des séquences d'ADN LINE.

La présente invention repose également sur l'utilisation de fluorophores et de filtres dont la combinaison permet d'assurer une peinture chromosomique fournissant des caryotypes très lisibles, c'est-à-dire d'obtenir des couleurs de peinture chromosomique contrastées et de bonne définition.

C'est pourquoi les sondes d'ADN décrites précédemment qui sont marquées directement ou indirectement par des techniques de fluorescence sont marquées, de préférence, par au moins un fluorophore choisi parmi le groupe suivant : isothiocyanate de fluoresceine (FITC), Rouge Texas (TR pour Texas Red), cyanine 3
 15 (Cy3), cyanine 5 (Cy5), cyanine 5,5 (Cy5,5), cyanine 7 (Cy7), Bopidy 630/650.

Le terme "sonde directement marquée" désigne ou décrit une sonde d'acide nucléique dont le marquage après formation d'hybride avec la cible est détectable sans traitement réactif subséquent de l'hybride. La composition en sonde de la présente invention est de type "marquage direct" pour 4 des 5 fluorophores utilisés.

20 Le terme "sonde indirectement marquée" désigne ou décrit une sonde d'acide nucléique dont le marquage après formation d'hybride avec la cible doit subir un traitement réactif supplémentaire avec un ou plusieurs réactifs pour y associer ainsi une ou plusieurs entités qui résulte(nt) finalement en un composé détectable. La composition de sondes utilisant le fluorophore Cy7 dans la présente invention est de

25 type marquage indirect.

La présente invention concerne également un ensemble de sondes destinées au marquage de chromosomes humains, caractérisées en ce qu'elles contiennent des sondes pour chacun des chromosomes humains ou pour un certain nombre d'entre eux. Cet ensemble de sondes permettra d'analyser en une seule fois un caryotype complet
 30 afin d'y détecter et d'y identifier d'éventuelles aberrations chromosomiques telles que décrites précédemment.

Enfin, la présente invention concerne également un procédé FISH multicolore destiné à l'étude du caryotype, caractérisé en ce que les sondes d'ADN sont marquées par des fluorophores et en ce que chaque fluorophore de longueur
 35 d'onde d'absorption et d'émission spécifique est couplé à un filtre optique de

fluorescence de longueur d'onde d'émission et à un filtre optique d'excitation spécifique, caractérisé en ce que :

- a) le fluorophore FITC ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 494 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 517 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 490DF30 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 530DF30 (Omega Optical),
- b) le fluorophore Cy3 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 554 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 568 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 546DF10 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 570DF10 (Omega Optical),
- c) le fluorophore TR ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 593 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 613 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 590DF10 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 615DF10 (Omega Optical),
- d) le fluorophore Cy5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 652 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 670 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 650DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 670DF10 (Omega Optical),
- e) le fluorophore Cy7 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 743 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 767 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 740DF25 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 780EFLP (Omega Optical),
- f) le fluorophore Cy5,5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 675 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 694 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 680DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 700EFLP (Omega Optical),
- g) le fluorophore Bodipy 630/650 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 632 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 658 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 630DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 650DF10 (Omega Optical).

Les filtres selon la présente invention sont tels :

- qu'ils soient de type 6 cavités,
- qu'ils aient une ADI de 0°;
- qu'ils aient un diamètre utile centré supérieur à 21 mm,
- qu'ils aient une épaisseur ≤ 7 mm,

- qu'ils aient une tolérance $\lambda_0 \pm 20\%$ de FWHM,
- qu'ils aient une tolérance sur FWHM de $\pm 20\%$ de FWHM,
- qu'ils aient une réjection hors bande passante OD5 de UV à 1200 nm
- qu'ils aient une courbe de transmission $T \geq 50\%$ à λ_0 .

5 Les fluorophores et les filtres précédents peuvent être utilisés pour le marquage des sondes selon la présente invention ou bien pour des sondes différentes utilisées pour la peinture chromosomique.

10 Dans la présente invention, on entend par "filtres" des filtres interférentiels à bande passante étroite qui transmettent la lumière à l'intérieur d'une bande spectrale donnée très étroite, centrée autour de la longueur d'onde λ_0 de référence. Ils sont caractérisés par leur courbe de transmission : $T = f(\lambda)$. La largeur de la bande est définie par la largeur totale à la moitié du maximum de transmission (FWHM pour "Full Width at Half Maximum transmission").

15 En dehors de la bande passante, le filtre laisse passer un signal résiduel qui a tout intérêt à être le plus atténué possible.

20 Les filtres interférentiels fonctionnent sur le principe des interférences constructives et destructives. La composante de base d'un filtre interférentiel est appelée cavité. Elle comporte deux piles de réflecteurs séparés par une couche d'un solide diélectrique. Plus le nombre de cavités est important, plus la forme de la courbe de transmission est rectangulaire (c'est-à-dire, plus la pente de cette courbe est importante). D'autre part, plus le nombre de cavités est important, meilleur est le coefficient d'atténuation en dehors de la bande passante.

25 Pour l'application de multifluorescence, les spectres d'excitation ou d'émission des fluorochromes utilisés sont très proches les uns des autres. Il faut donc récupérer le minimum de signal possible en dehors de la bande passante. C'est pourquoi, on a choisi des filtres à 6 cavités qui offrent les meilleures caractéristiques à ce niveau.

Les filtres utilisés ont les spécifications suivantes :

- ils sont conçus pour être utilisés en incidence normale de la lumière,
- 30 - la tolérance sur la longueur d'onde centrale (λ_0) est de $\pm 20\%$ de la bande passante, par exemple, pour un filtre de bande passante de 10 nm, λ_0 sera définie avec une tolérance de ± 2 nm,
- la tolérance sur la largeur de la bande passante est de $\pm 20\%$,
- le coefficient de transmission T de ces filtres est supérieur à 50%,

- 5 - la réjection hors bande passante de ces filtres est de 50D de l'ultra-violet à 1200 nm, ceci signifie qu'en dehors de la bande passante, le coefficient de transmission est de 10^{-5} , soit 0,001%. Pour des filtres standards, la réjection hors bande passante est assurée pour des longueurs d'onde allant de $0,8 \lambda_0$ à $1,2 \lambda_0$, par exemple, pour un filtre de $\lambda_0 = 620$ nm, la réjection hors bande passante se fait seulement entre 500 et 740nm. Or, pour l'application de multifluorescence, on observe des fluorochromes dont les spectres s'étendent de 350 à 800 nm. C'est pourquoi on a utilisé des filtres dont la réjection hors bande passante est assurée de l'ultra-violet à 1200 nm.

10 La présente invention concerne enfin un kit de marquage caractérisé en ce qu'il comprend au moins des sondes d'ADN telles que décrites précédemment ou un ensemble de sondes tel que mentionné précédemment.

La présente invention concerne un kit de diagnostic FISH multicolore, caractérisé en ce qu'il comprend les sondes d'ADN telles que décrites précédemment
15 ou un ensemble de sondes d'ADN tel que mentionné précédemment et une combinaison de filtres et de fluorophores tels que décrits précédemment.

La technique FISH ou multi-FISH à laquelle il est ou il sera fait allusion à plusieurs reprises dans la présente description est notamment décrite dans Speicher et al., 1996 ; Schröck et al., 1996.

20 D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples ci-après.

EXEMPLES

MATERIEL ET METHODES

1. Préparation des sondes

25 L'ADN génomique extrait de différentes lignées hybrides somatiques homme-rongeur (NIGMS Human genetic Mutant Cell Repository, Coriell Institute for Medical Research, Camdem) (tableau 1) sert de matrice pour la PCR.

Tableau 1

Chromosome	Référence lignée
1	GM 13139
2	GM 10826B
3	GM 10253
4	GM 10115
5	GM 10114
6	GM 11580
7	GM 10791
8	GM 10156C
9	GM 10611
10	GM 10926B
11	GM10927A
12	GM 10868
13	GM 10898
14	GM 11535
15	GM 11715
16	GM 10567
17	GM 10498
18	GM 11010
19	GM 10449
20	GM 13260
21	GM 10323
22	GM 10888
X	GM 6318B

5 La PCR est réalisée soit en présence uniquement de l'amorce SR1 (située à l'extrémité 3' de la séquence consensus Alu, position 241 à 261 :

5' CCACTGCACTCCAGCCTGGG 3' (SEQ ID N° 1)

(Romana et al., 1993), soit en présence de l'amorce SR1 et de l'amorce L1H:

5' CATGGCACATGTATACATATGTAAC(A/T)AACC 3' (SEQ ID N° 2 et N° 3)

(Ledbetter et al., 1990). Lorsqu'on utilise au cours de la PCR uniquement l'amorce SR1, le produit d'amplification marqué et utilisé comme sonde sur chromosomes métaphasiques colore presque totalement le chromosome correspondant (à l'exception des régions centromériques) mais avec un profil de bandes de type R (comme cela a été décrit par Lichter et al., 1990 avec d'autres types d'amorces Alu). Afin d'avoir une meilleure représentation des bandes R négatives (bandes peu fluorescentes) on effectue également une PCR en incorporant les 2 amorces : SR1 et L1. Ainsi, lorsque les 2 produits d'amplification (SR1 et SR1/L1) sont mélangés et utilisés comme sonde, la fluorescence des bandes R négatives est augmentée et les régions télomériques sont parfaitement délimitées.

Conditions de PCR

La réaction de PCR a lieu dans un volume final de 50 µl contenant 500 ng d'ADN génomique (hybride somatique), 1 µM de chaque oligonucléotide (soit 1 µM SR1, soit 1 µM SR1 et 1 µM L1H), 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,01% gélatine, 250 µM de chaque déoxynucléotide triphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) et 2,5 U d'ADN-polymérase *thermophilus aquaticus* (Perkin-Elmer-Cetus). La dénaturation initiale est effectuée à 96°C pendant 6 min., suivie de 30 cycles : dénaturation à 94°C pendant 1 min., association à 63°C pendant 1 min., élongation à 72°C pendant 10 min. A la fin des cycles, une élongation finale à 72°C pendant 10 min. est réalisée.

Les 2 produits d'amplification (SR1 et SR1/L1H) sont mélangés puis précipités à l'éthanol. Le culot d'ADN est repris dans 20 µl d'eau et la concentration d'ADN est estimée sur un gel d'agarose 1,3%.

Marquage des sondes par "Nick translation"

15 µg du mélange de produits PCR peuvent être marqués au cours d'une seule réaction de Nick translation. La réaction a alors lieu dans un volume final de 500 µl, contenant 20 µM de chacun des déoxynucléotides triphosphates (dATP, dGTP, dCTP), 10 µM de dTTP et 10 µM de dUTP modifié, Tris-HCl 50 µM, MgCl₂ 5 µM, β-mercaptoéthanol 1 µM et 20 U de mélange d'enzymes (Dnase/Polymérase : Boehringer-Mannheim). Pour marquer directement la sonde en fluorescence le nucléotide modifié peut être soit du dUTP-12-FITC (Boehringer-Mannheim) ou dUTP-12-Texas red (Molecular Probes) ou dUTP-Cy3 (Amersham) ou dUTP-Cy5 (Amersham). Par contre, pour un marquage indirect on utilisera du dUTP-16-biotinylé (Boehringer-Mannheim). Le marquage est réalisé en tube Eppendorf (2 ml) sur la nuit

à 15-16°C. Les nucléotides libres sont ensuite éliminés par précipitation de la sonde à l'éthanol. Le culot d'ADN est repris dans 500 µl de TE 10:1 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH8) afin que la sonde soit à une concentration d'environ 30 ng/µl.

Composition du mélange des 23 sondes de peinture chromosomique

- 5 Chaque sonde spécifique d'un chromosome a été marquée individuellement avec les différents dUTP-modifiés (fluorescents ou non). En fonction de la richesse en
-
- 10 bandes R et G de chacun des chromosomes et en fonction de leur taille, on a a priori établi ceux qui devaient ou non être composés de différents fluorochromes. Ce choix dépendait également, pour chaque fluorochrome, de la combinaison des filtres
- 15 d'excitation et d'émission. En effet, lorsqu'une sonde est marquée en proportion équivalente avec différents fluorochromes, les intensités de signal des différents fluorochromes ne sont pas forcément comparables. Cela dépend en effet de la qualité des filtres d'excitation et d'émission pour chaque fluorochrome, mais aussi de la
- 20 l'intensité du flux lumineux à l'excitation et donc du pouvoir spectral de la source du lumière (Lampe Mercure HBO 100 W - OSRAM). Parmi tous ces paramètres, on a plutôt choisi d'optimiser le pouvoir de résolution des combinaisons de filtres, afin d'obtenir à l'émission le meilleur rapport signal/bruit de fond pour chaque fluorochrome. En effet, les différences d'intensité de fluorescence peuvent être
- 25 compensées d'une part en augmentant ou diminuant les temps d'exposition au cours de l'acquisition de l'image par la caméra (Hamamatsu C4880), mais également en faisant varier les concentrations des sondes selon le marqueur fluorescent utilisé. La composition des 23 sondes de peinture chromosomique a donc été définie expérimentalement et de façon précise après de nombreuses expériences de contrôle (tableau 2).

Tableau 2

<u>Chrom.</u>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X
<u>Fluor.</u>																							
FITC			30		50			60	30				60	25	50	30			25			10	
Cy3	35								20	30	30			20	15	20	15		10	20	30		30
TR	40						30			25		35	45		15				20	20	30	15	
Cy5				50		40		30			40	50				20	25			30		20	
Biotine			25			30	35			20				25			20	40	20				30
Mélange 1470ng=	35	40	55	50	50	70	75	90	50	75	70	85	95	70	80	70	60	40	75	70	60	45	60

Nom complet des fluorochromes :

FITC : Fluorescein isothiocyanate ; TR : Texas Red ; Cy3 : Cyanine 3 ; Cy5 : Cyanine 5 ; Cy7 : Cyanine 7

Quatre cents μg (environ 27 fois) d'ADN Cot1 (ADN compétiteur humain) sont rajoutés à ces 1470 ng de mélange de sondes chromosomiques (50 sondes différentes). Le mélange d'ADN est ensuite précipité à l'éthanol. Le culot est repris dans 10 μl de mélange d'hybridation (50% formamide, 10% sulfate dextran, 2 X SSC (pH 7), 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ d'ADN de sperme de hareng soniqué).

2. Hybridation *in situ* fluorescente

La procédure est celle décrite par Cherif et al., 1990, avec quelques modifications.

Préparation des chromosomes en métaphase

La préparation des chromosomes métaphasiques est réalisée à partir d'une culture de lymphocytes circulants obtenus par ponction veineuse d'un sujet normal. Les lymphocytes stimulés par la phytohémagglutinine (PHA) (100 μl pour 8 ml de culture) sont mis en culture pendant 72 heures à 37°C dans du milieu RPMI-1640. Les cellules sont ensuite synchronisées en ajoutant du méthotrexate (10 μM) pendant 17 heures puis rincées et remises en culture en présence de 5-bromodéoxyuridine (BrdU) (0,1 mM) pendant 6 heures. Après action de la colchicine (1 mg/ml) pendant 15 min, l'éclatement des cellules est obtenu par resuspension dans une solution hypotonique de KCl (75 mM). Les chromosomes sont fixés dans un mélange méthanol/acide acétique (3 vol/1 vol) et une à deux gouttes de suspension cellulaire sont étalées sur chaque lame. Les lames séchées à température ambiante pendant 2 à 3 jours peuvent ensuite être stockées à -20°C pendant plusieurs mois.

Préparation des lames

Les lames sont traitées à l'ARNase (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pendant 1 heure à 37°C puis rincées 3 fois (5 min. chaque) dans une solution de 2 X SSC, pH 7. Les lames sont ensuite déshydratées par passages successifs dans une série de bains d'éthanol à concentration croissante (70%, 80%, 90% et 100% et 2 min. par bain), et séchées. La dénaturation de l'ADN chromosomique se fait par immersion des lames dans un bain de formamide 70% / 2 X SSC (pH 7) à 70°C pendant 2 minutes. La dénaturation est arrêtée en plongeant les lames (2 minutes) dans de l'éthanol 70% refroidi à -20°C et maintenu dans un bac à glace. Puis les lames sont déshydratées par passages successifs dans une série de bains d'éthanol à concentration croissante et séchées. Les lames sont ensuite incubées pendant 8 à 10 min. à 37°C dans une solution (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 2 mM CaCl_2) contenant de la protéinase K (100 ng/ml) puis déshydratées dans une série de bains d'éthanol et séchées.

Hybridation et détection du signal

Le mélange de sondes et d'ADN compétiteur (10 µl) est dénaturé 10 min. à 70°C puis plongé dans de la glace et préhybridé pendant au moins 3 heures à 37°C. Ce mélange est ensuite déposé sur la lame et recouvert d'une lamelle (18 X 22 mm).

5 L'hybridation a lieu pendant 2-3 jours à 37°C en chambre humide.

Les lames sont ensuite lavées dans une série de 3 bains de formamide 50%, 2 X SSC, pH 7 (3 min. chaque) à une température de 42-45°C, suivis de 5 lavages dans 2 X SSC, pH 7 (2 minutes chaque) et d'un lavage d'une minute dans une solution 1 X BN (0,1 M bicarbonate de sodium, 0,05% nonidet P-40). Les sondes biotinylées sont
10 détectées par adjonction d'avidine (Vector Laboratories Biosys) couplée à la cyanine7 (Amersham) (Avidine-Cy7) (5 µg/ml). Le couplage de l'avidine à la cyanine 7 a été réalisé avec un kit de couplage (Amersham). Afin de diminuer les problèmes de bruit de fond liés à des liaisons non spécifiques de l'avidine, les lames sont préalablement incubées pendant 10 minutes dans une solution 1 X BN contenant 5% de lait en poudre
15 écrémé. Les lames sont ensuite incubées 1/2 heure à 37°C dans une solution contenant de l'avidine-Cy7 (5 µg/ml dans 1 X BN + 5% de lait en poudre) puis lavées successivement 3 fois (2 minutes) dans une solution 1 X BN à 45°C. Le signal fluorescent est amplifié par adjonction d'une couche d'anticorps anti-avidine biotinylés (5 µg/ml) (Vector Laboratories, Biosys France), suivie d'une couche d'avidine-Cy7 (5
20 µg/ml) selon le protocole décrit par Pinkel et al., 1986. Pour chaque couche, les lames sont incubées pendant 30 minutes à 37°C puis lavées 3 fois dans une solution 1 X BN. Les sondes marquées avec dUTP-FITC, dUTP-TR, dUTP-Cy3 et dUTP-Cy5 ne nécessitent aucune étape de révélation supplémentaire.

L'observation des lames est réalisée à l'aide d'un photomicroscope à
25 épifluorescence (DMRX B, LEICA) équipé de la combinaison de filtres décrite précédemment. Avant l'acquisition des images, 20 µl d'une solution anti-fade (Johnson et al., 1981) sont déposés sur chaque lame et recouverts d'une lamelle (solution anti-fade : 100 mg de PPD (p-phénylènediamine, Sigma) dans une solution composée de 10 ml de PBS et 90 ml de glycérol ; le pH de la solution est ajusté à 8,0 avec du NaOH
30 0,1 M) ; ceci afin d'éviter l'extinction rapide de la fluorescence émise par les différents fluorochromes lorsqu'ils sont soumis à une forte irradiation.

3. Exemple d'utilisation d'une combinaison de 6 fluorophores

La cyanine 7 étant un fluorochrome relativement instable, on a essayé de le remplacer par un autre fluorochrome. C'est le cas du Bodipy 630/650 (Molecular
35 Probes). Couplé à un anticorps ou une molécule d'avidine, il permet de révéler

indirectement une sonde marquée à la biotine, à la digoxigénine ou au dinitrophénol (DNP). Dans ce cas, le choix des 5 fluorochromes pour la multifluorescence ne peut plus être le même car les spectres d'absorption et d'émission de la cyanine 5 et du Bodipy 630/650 sont trop proches pour qu'il y ait une bonne discrimination entre ces deux fluorochromes. Le choix sera le suivant :

- isothiocyanate fluoresceine (FITC)

- ~~rouge Texas (TR)~~

- Cyanine 3 (Cy3)

- Bodipy 630/650

10 - Cyanine 5,5 (Cy5,5)

Ce choix a également l'avantage de permettre quand même d'utiliser la cyanine 7 comme 6ème fluorochrome en cas de nécessité (par exemple pour des applications où l'on ne peut pas faire du marquage combinatoire de sonde, et où il serait avantageux d'avoir différentes sondes pouvant être discriminées avec un maximum de fluorochromes différents).

Dans ce cas, la Cy5,5 devra également être couplée à un anticorps ou une molécule d'avidine pour pouvoir révéler une sonde marquée à la biotine, à la digoxigénine ou au DNP.

Par exemple, pour le caryotypage en multifluorescence, les différents systèmes de marquage et de révélation des sondes seront :

<u>Marquage</u>	<u>Type de marquage</u>	<u>Révélation</u>
isothiocyanate fluoresceine (FITC)	direct	non
rouge Texas (TR)	direct	non
25 Cyanine 3 (Cy3)	direct	non
digoxigénine (Dig)	indirect	anti dig-Bodipy 630/650
biotine (Bio)	indirect	avidine-Cy5,5

Au cas où l'on souhaiterait utiliser 6 fluorochromes à la fois, le choix pourrait être :

	<u>Marquage</u>	<u>Type de marquage</u>	<u>Révélation</u>
	isothiocyanate fluoresceine (FITC)	direct	non
	rouge Texas (TR)	direct	non
	Cyanine 3 (Cy3)	direct	non
5	dinitrophénol (DNP)	indirect	anti DNP-Bodipy 630/650
	digoxigénine (Dig)	indirect	anti dig-Cy5,5
	biotine (Bio)	indirect	avidine-Cy7

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: GENSET
 - (B) RUE: 1, RUE ROYALE
 - (C) VILLE: PARIS
 - (E) PAYS: FRANCE
 - (F) CODE POSTAL: 75008
-

(ii) TITRE DE L' INVENTION: SONDAS FLUORESCENTES DE PEINTURE CHROMOSOMIQUE

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 3

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: SRI
-

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

CCACTGCACT CCAGCCTGGG

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Homo sapiens

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: L1H

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

CATGGCACAT GTATACATAT GTAACAAACC

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 30 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Homo sapiens

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: L1H

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CATGGCACAT GTATACATAT GTAAC TAACC

30

REFERENCES

- Cherif D., Julier C., Delattre O., Derre J., Lathrop GM., Berger R., (1990). Simultaneous localization of cosmids and chromosome R-banding by fluorescence microscopy: Application to regional mapping of chromosome 11. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6639.
- Dutrillaux B., Lejeune J. (1971). Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. C.R. Acad. Sci. 272, 2638.
- Johnson G.D., De Nogueira C., Arango J.G.M. (1981). A simple method for reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. J. Immunol. Methods 43, 349.
- Korenberg J.R., Rikowski M.C. (1988). Human genome organization: Alu, Lines and the molecular structure of metaphase chromosome bands. Cell 53, 391.
- Ledbetter S.A., Garcia-Heras J., Ledbetter D.H. (1990). "PCR-karyotype" of human chromosomes in somatic cell hybrids. Genomics 8, 614.
- Lichter P., Ledbetter S.A., Ledbetter D.H., Ward D.C. (1990). Fluorescence *in situ* hybridization with Alu and L1 polymerase chain reaction probes for rapid characterization of human chromosomes in hybrid cell lines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6634.
- Pinkel D., Straume T., Gray J.W. (1996). Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity fluorescence hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2934.
- Romana S.P., Tachdjian G., Druart L., Cohen D., Berger R., Cherif D. (1993). A simple method for prenatal diagnosis of trisomy 21 on uncultured amniocytes. Eur. J. Hum. Genet. 1, 245.
- Sabile A., Poras I., Cherif D., Goodfellow P., Avner P. (1997). Isolation of monochromosomal hybrid for mouse chromosomes 3,6, 10, 12, 14 and 18. Mammalian Genome 8, 81.
- Schröck E., du Manoir S., Veldman T., Schoell B., Wienberg J., Ferguson-Smith M.A., Ning Y., Ledbetter D.H., Bar-Am I., Soenksen D., Garini Y., Ried T. (1996). Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. Science 273, 494-497.
- Speicher M.R., Ballard S.G., Ward DC. (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. Nature Genetics 12, 368-375.
- Summer A.T., Evans H.J., Buckland R.A. (1971). A new technique for distinguishing between human chromosomes. Nature (New Biol) 232, 31.

REVENDICATIONS

1) Sondes destinées au marquage d'un chromosome, caractérisées en ce qu'elles sont composées d'un ensemble de segments d'ADN davantage représentés dans
5 certaines bandes chromosomiques et sont obtenues par amplification IRS-PCR à partir desdits chromosomes, les segments d'ADN étant amplifiés à partir d'amorces spécifiques des séquences d'ADN Alu et LINE.

2) Sondes selon la revendication 1, caractérisées en ce que les segments d'ADN amplifiés par IRS-PCR ont pour source des hybrides somatiques
10 rongeur/homme monochromosomiques.

3) Sondes selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisées en ce que lesdites sondes sont spécifiques de chromosome humain.

4) Sondes selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que les segments d'ADN sont davantage représentés dans un type de bandes cytogénétiques,
15 de préférence les bandes R.

5) Sondes selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisées en ce que les amorces spécifiques utilisées comprennent ou sont les amorces de séquences :

- SEQ ID N° 1 pour l'amorce spécifique des séquences d'ADN Alu,
- SEQ ID N° 2 pour l'amorce spécifique des séquences d'ADN LINE et
- 20 - SEQ ID N° 3 pour l'amorce spécifique des séquences d'ADN LINE.

6) Sondes selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisées en ce que les sondes sont issues d'un mélange de deux produits d'amplification IRS-PCR composé de :

- produit d'amplification PCR obtenu par l'utilisation de l'amorce spécifique des
25 séquences d'ADN Alu,
- produit d'amplification PCR obtenu par l'utilisation de l'amorce spécifique des séquences d'ADN Alu et de l'amorce spécifique des séquences d'ADN LINE.

7) Sondes selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisées en ce que les segments d'ADN sont marqués directement ou indirectement par les techniques de
30 fluorescence.

8) Sondes ADN selon la revendication 7 caractérisées en ce que les segments d'ADN sont marqués par au moins un fluorophore choisi parmi l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine 3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), la cyanine 5,5 (Cy5,5), la cyanine 7 (Cy7), le Bodipy 630/650.

9) Ensemble de sondes destinées au marquage des chromosomes humains, caractérisées en ce qu'elles contiennent des sondes selon l'une des revendications 1 à 8 pour chacun des chromosomes humains ou pour un certain nombre d'entre eux.

5 10) Procédé de production de sondes destiné au marquage de chromosomes humains, caractérisé en ce que les sondes sont obtenues par amplification IRS-PCR à partir desdits chromosomes en utilisant des amorces PCR spécifiques des séquences d'ADN Alu et LINE.

10 11) Procédé de production de sondes destiné au marquage de chromosomes humains, caractérisé en ce que les sondes sont obtenues par amplification IRS-PCR à partir desdits chromosomes en utilisant des amorces PCR spécifiques des séquences d'ADN Alu, le produit d'amplification étant mélangé au produit d'amplification IRS-PCR obtenu selon le procédé décrit dans la revendication 10.

12) Sondes destinées au marquage de chromosomes humains obtenues par un procédé selon les revendications 10 et 11.

15 13) Procédé dit FISH multicolore, caractérisé en ce qu'on utilise pour sa mise en œuvre des sondes selon l'une des revendications 1 à 8 ou 12 ou un ensemble de sondes selon la revendication 9.

20 14) Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que chaque fluorophore de longueur d'onde d'absorption et d'émission spécifique est couplé à un filtre optique de fluorescence de longueur d'onde d'émission et à un filtre optique de fluorescence d'excitation spécifique, caractérisées en ce que :

- a) le fluorophore FITC ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 494 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 517 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 490DF30 (Omega Optical) et à l'émission de type 530DF30 (Omega Optical),
- 25 b) le fluorophore Cy3 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 554 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 568 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 546DF10 (Omega Optical) et à l'émission de type 570DF10 (Omega Optical),
- 30 c) le fluorophore TR ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 593 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 613 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 590DF10 (Omega Optical) et à l'émission de type 615DF10 (Omega Optical),
- 35 d) le fluorophore Cy5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 652 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 670 nm est couplé à un filtre à

l'excitation de type 650DF20 (Omega Optical) et à l'émission de type 670DF10 (Omega Optical),

5 e) le fluorophore Cy7 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 743 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 767 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 740DF25 (Omega Optical) et à l'émission de type 780EFLP (Omega Optical),

10 ~~f) le fluorophore Cy5,5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 675 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 694 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 680DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 700EFLP (Omega Optical),~~

g) le fluorophore Bodipy 630/650 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 632 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 658 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 630DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 650DF10 (Omega Optical).

15 15) Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que les filtres optiques présentent les qualités suivantes :

- ils sont de type 6 cavités,
- ils ont une ADI de 0°;
- ils ont un diamètre utile centré supérieur à 21 mm,
- 20 - ils ont une épaisseur ≤ 7 mm,
- ils ont une tolérance $\lambda_0 \pm 20\%$ de FWHM,
- ils ont une tolérance sur FWHM de $\pm 20\%$ de FWHM,
- ils ont une réjection hors bande passante OD5 de UV à 1200 nm
- ils ont une courbe de transmission $T \geq 50\%$ à λ_0 .

25 16) Procédé selon l'une des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que lesdites sondes sont utilisées pour l'étude des caryotypes et des caryotypes de réarrangements chromosomiques.

30 17) Kit de diagnostic caractérisé en ce qu'il comprend au moins des sondes ADN telles que décrites dans les revendications 1 à 8 ou 12 ou un ensemble de sondes selon la revendication 9.

(18) Kit de diagnostic FISH multicolore caractérisé en ce qu'il comprend au moins 2 des fluorophores choisis parmi l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine 3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), la cyanine 5,5 (Cy5,5), la cyanine 7 (Cy7), le Bodipy 630/650.

19) Kit selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il comprend au moins 3 des fluorophores choisis parmi l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine 3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), la cyanine 5,5 (Cy5,5), la cyanine 7 (Cy7), le Bodipy 630/650.

5 20) Kit selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il comprend au moins 4 des fluorophores choisis parmi l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine 3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), la cyanine 5,5 (Cy5,5), la cyanine 7 (Cy7), le Bodipy 630/650.

10 21) Kit selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il comprend au moins 5 des fluorophores choisis parmi l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine 3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), la cyanine 5,5 (Cy5,5), la cyanine 7 (Cy7), le Bodipy 630/650.

15 22) Kit de diagnostic FISH multicolore, caractérisé en ce qu'il comprend les 5 fluorophores suivants : l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine 3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), la cyanine 7 (Cy7).

20 23) Procédé FISH multicolore destiné à l'étude du caryotype, caractérisé en ce que les sondes d'ADN sont marquées par des fluorophores et en ce que chaque fluorophore de longueur d'onde d'absorption et d'émission spécifique est couplé à un filtre optique de longueur d'onde d'émission spécifique et à un filtre optique d'excitation spécifique, caractérisées en ce que :

- a) le fluorophore FITC ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 494 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 517 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 490DF30 (Omega Optical) et à l'émission de type 530DF30 (Omega Optical),
- 25 b) le fluorophore Cy3 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 554 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 568 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 546DF10 (Omega Optical) et à l'émission de type 570DF10 (Omega Optical),
- 30 c) le fluorophore TR ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 593 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 613 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 590DF10 (Omega Optical) et à l'émission de type 615DF10 (Omega Optical),
- d) le fluorophore Cy5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 652 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 670 nm est couplé à un filtre à

l'excitation de type 650DF20 (Omega Optical) et à l'émission de type 670DF10 (Omega Optical),

- 5 e) le fluorophore Cy7 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 743 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 767 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 740DF25 et à l'émission de type 780EFLP,
- f) le fluorophore Cy5,5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 675 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 694 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 680DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 700EFLP (Omega Optical),
- 10 g) le fluorophore Bodipy 630/650 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 632 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 658 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 630DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 650DF10 (Omega Optical).

24) Kit de diagnostic FISH multicolore, caractérisé en ce qu'il comprend
15 les sondes d'ADN selon la revendication 8 et en ce que chaque fluorophore de longueur d'onde d'absorption et d'émission spécifique est couplé à un filtre optique de longueur d'onde d'émission spécifique et à un filtre optique d'excitation spécifique, caractérisées en ce que :

- 20 a) le fluorophore FITC ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 494 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 517 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 490DF30 (Omega Optical) et à l'émission de type 530DF30 (Omega Optical),
- b) le fluorophore Cy3 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 554 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 568 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 546DF10 (Omega Optical) et à l'émission de type 570DF10 (Omega Optical),
- 25 c) le fluorophore TR ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 593 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 613 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 590DF10 (Omega Optical) et à l'émission de type 615DF10 (Omega Optical),
- 30 d) le fluorophore Cy5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 652 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 670 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 650DF20 (Omega Optical) et à l'émission de type 670DF10 (Omega Optical),

- e) le fluorophore Cy7 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 743 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 767 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 740DF25 et à l'émission de type 780EFLP,
- 5 f) le fluorophore Cy5,5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 675 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 694 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 680DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 700EFLP (Omega Optical),
- 10 g) le fluorophore Bodipy 630/650 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 632 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 658 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 630DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 650DF10 (Omega Optical).

ORIGINAL

CABINET REGIMBEAU
CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
28, Avenue Kléber
75116 PARIS

- la réjection hors bande passante de ces filtres est de 5OD de l'ultra-violet à 1200 nm, ceci signifie qu'en dehors de la bande passante, le coefficient de transmission est de 10^{-5} , soit 0,001%. Pour des filtres standards, la réjection hors bande passante est assurée pour des longueurs d'onde allant de $0,8 \lambda_0$ à $1,2 \lambda_0$, par exemple, pour un filtre de $\lambda_0 = 620$ nm, la réjection hors bande passante se fait
5 seulement entre 500 et 740nm. Or, pour l'application de multifluorescence, on observe des fluorochromes dont les spectres s'étendent de 350 à 800 nm. C'est pourquoi on a utilisé des filtres dont la réjection hors bande passante est assurée de l'ultra-violet à 1200 nm.

10 La présente invention concerne enfin un kit de diagnostic caractérisé en ce qu'il comprend au moins des sondes d'ADN telles que décrites précédemment ou un ensemble de sondes tel que mentionné précédemment.

La présente invention concerne également un kit de diagnostic caractérisé en ce qu'il comprend au moins des sondes d'ADN telles que décrites précédemment ou
15 un ensemble de sondes tel que mentionné précédemment caractérisé en ce qu'il comprend au moins 2, au moins 3, ou au moins 4, de préférence au moins 5 des fluorophores choisis parmi l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine 3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), la cyanine 5,5 (Cy5,5), la cyanine 7 (Cy7), le Bodipy 630/650. Dans un mode préféré de réalisation, le kit de diagnostic est
20 caractérisé en ce qu'il comprend au moins des sondes d'ADN telles que décrites précédemment ou un ensemble de sondes tel que mentionné précédemment et en ce qu'il comprend les 5 fluorophores suivants : l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine 3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), la cyanine 7 (Cy7).

La technique FISH ou multi-FISH à laquelle il est ou il sera fait allusion à
25 plusieurs reprises dans la présente description est notamment décrite dans Speicher et al., 1996 ; Schröck et al., 1996.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples ci-après.

EXEMPLES

30 MATERIEL ET METHODES

1. Préparation des sondes

L'ADN génomique extrait de différentes lignées hybrides somatiques homme-rongeur (NIGMS Human genetic Mutant Cell Repository, Coriell Institute for Medical Research, Camdem) (tableau 1) sert de matrice pour la PCR.

REVENDEICATIONS

1) Sondes destinées au marquage d'un chromosome, caractérisées en ce qu'elles sont composées d'un ensemble de segments d'ADN davantage représentés dans
5 certaines bandes chromosomiques et sont obtenues par amplification IRS-PCR à partir desdits chromosomes, les segments d'ADN étant amplifiés à partir d'amorces spécifiques des séquences d'ADN Alu et LINE.

2) Sondes selon la revendication 1, caractérisées en ce que les segments d'ADN amplifiés par IRS-PCR ont pour source des hybrides somatiques
10 rongeur/homme monochromosomiques.

3) Sondes selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisées en ce que lesdites sondes sont spécifiques de chromosome humain.

4) Sondes selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que les segments d'ADN sont davantage représentés dans un type de bandes cytogénétiques,
15 de préférence les bandes R.

5) Sondes selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisées en ce que les amorces spécifiques utilisées comprennent ou sont les amorces de séquences :

- SEQ ID N° 1 pour l'amorce spécifique des séquences d'ADN Alu,
- SEQ ID N° 2 pour l'amorce spécifique des séquences d'ADN LINE et
- 20 - SEQ ID N° 3 pour l'amorce spécifique des séquences d'ADN LINE.

6) Sondes selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisées en ce que les sondes sont issues d'un mélange de deux produits d'amplification IRS-PCR composé de :

- produit d'amplification PCR obtenu par l'utilisation de l'amorce spécifique des
25 séquences d'ADN Alu,
- produit d'amplification PCR obtenu par l'utilisation de l'amorce spécifique des séquences d'ADN Alu et de l'amorce spécifique des séquences d'ADN LINE.

7) Sondes selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisées en ce que les segments d'ADN sont marqués directement ou indirectement par les techniques de
30 fluorescence.

8) Sondes ADN selon la revendication 7 caractérisées en ce que les segments d'ADN sont marqués par au moins un fluorophore choisi parmi l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine 3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), la cyanine 5,5 (Cy5,5), la cyanine 7 (Cy7), le Bodipy 630/650.

9) Ensemble de sondes destinées au marquage des chromosomes humains, caractérisées en ce qu'elles contiennent des sondes selon l'une des revendications 1 à 8 pour chacun des chromosomes humains ou pour un certain nombre d'entre eux.

10) Procédé de production de sondes destiné au marquage de chromosomes humains, caractérisé en ce que les sondes sont obtenues par amplification IRS-PCR à partir desdits chromosomes en utilisant des amorces PCR spécifiques des séquences d'ADN Alu et LINE.

11) Procédé de production de sondes destiné au marquage de chromosomes humains, caractérisé en ce que les sondes sont obtenues par amplification IRS-PCR à partir desdits chromosomes en utilisant des amorces PCR spécifiques des séquences d'ADN Alu, le produit d'amplification étant mélangé au produit d'amplification IRS-PCR obtenu selon le procédé décrit dans la revendication 10.

12) Sondes destinées au marquage de chromosomes humains obtenues par un procédé selon les revendications 10 et 11.

13) Procédé dit FISH multicolore, caractérisé en ce qu'on utilise pour sa mise en œuvre des sondes selon l'une des revendications 1 à 8 ou 12 ou un ensemble de sondes selon la revendication 9.

14) Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que chaque fluorophore de longueur d'onde d'absorption et d'émission spécifique est couplé à un filtre optique de fluorescence de longueur d'onde d'émission et à un filtre optique de fluorescence d'excitation spécifique, caractérisées en ce que :

- a) le fluorophore FITC ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 494 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 517 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 490DF30 (Omega Optical) et à l'émission de type 530DF30 (Omega Optical),
- b) le fluorophore Cy3 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 554 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 568 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 546DF10 (Omega Optical) et à l'émission de type 570DF10 (Omega Optical),
- c) le fluorophore TR ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 593 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 613 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 590DF10 (Omega Optical) et à l'émission de type 615DF10 (Omega Optical),
- d) le fluorophore Cy5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 652 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 670 nm est couplé à un filtre à

l'excitation de type 650DF20 (Omega Optical) et à l'émission de type 670DF10 (Omega Optical),

- 5 e) le fluorophore Cy7 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 743 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 767 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 740DF25 (Omega Optical) et à l'émission de type 780EFLP (Omega Optical),

- 10 f) le fluorophore Cy5,5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 675 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 694 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 680DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 700EFLP (Omega Optical),

- g) le fluorophore Bodipy 630/650 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 632 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 658 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 630DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 650DF10 (Omega Optical).

- 15 15) Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que les filtres optiques présentent les qualités suivantes :

- 20 - ils sont de type 6 cavités,
- ils ont une ADI de 0°;
- ils ont un diamètre utile centré supérieur à 21 mm,
- ils ont une épaisseur ≤ 7 mm,
- ils ont une tolérance $\lambda_0 \pm 20\%$ de FWHM,
- ils ont une tolérance sur FWHM de $\pm 20\%$ de FWHM,
- ils ont une réjection hors bande passante OD5 de UV à 1200 nm
- ils ont une courbe de transmission $T \geq 50\%$ à λ_0 .

- 25 16) Procédé selon l'une des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que lesdites sondes sont utilisées pour l'étude des caryotypes et des caryotypes de réarrangements chromosomiques.

- 30 17) Kit de diagnostic caractérisé en ce qu'il comprend au moins des sondes ADN telles que décrites dans les revendications 1 à 8 ou 12 ou un ensemble de sondes selon la revendication 9.

- 18) Kit selon la revendication 17 caractérisé en ce qu'il comprend au moins 2 des fluorophores choisis parmi l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine 3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), la cyanine 5,5 (Cy5,5), la cyanine 7 (Cy7), le Bodipy 630/650.

19) Kit selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il comprend au moins 3 des fluorophores choisis parmi l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine 3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), la cyanine 5,5 (Cy5,5), la cyanine 7 (Cy7), le Bodipy 630/650.

5 20) Kit selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il comprend au moins 4 des fluorophores choisis parmi l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine 3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), la cyanine 5,5 (Cy5,5), la cyanine 7 (Cy7), le Bodipy 630/650.

10 21) Kit selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il comprend au moins 5 des fluorophores choisis parmi l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine 3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), la cyanine 5,5 (Cy5,5), la cyanine 7 (Cy7), le Bodipy 630/650.

15 22) Kit selon la revendication 18 caractérisé en ce qu'il comprend les 5 fluorophores suivants : l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine 3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), la cyanine 7 (Cy7).

20 23) Procédé FISH multicolore destiné à l'étude du caryotype, caractérisé en ce que les sondes d'ADN sont marquées par des fluorophores et en ce que chaque fluorophore de longueur d'onde d'absorption et d'émission spécifique est couplé à un filtre optique de longueur d'onde d'émission spécifique et à un filtre optique d'excitation spécifique, caractérisées en ce que :

- a) le fluorophore FITC ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 494 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 517 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 490DF30 (Omega Optical) et à l'émission de type 530DF30 (Omega Optical),
- 25 b) le fluorophore Cy3 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 554 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 568 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 546DF10 (Omega Optical) et à l'émission de type 570DF10 (Omega Optical),
- c) le fluorophore TR ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 593 nm et
30 une longueur d'onde maximale d'émission de 613 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 590DF10 (Omega Optical) et à l'émission de type 615DF10 (Omega Optical),
- d) le fluorophore Cy5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 652 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 670 nm est couplé à un filtre à

l'excitation de type 650DF20 (Omega Optical) et à l'émission de type 670DF10 (Omega Optical),

5 e) le fluorophore Cy7 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 743 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 767 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 740DF25 et à l'émission de type 780EFLP,

f) le fluorophore Cy5,5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 675 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 694 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 680DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 700EFLP (Omega Optical),

10 g) le fluorophore Bodipy 630/650 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 632 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 658 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 630DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 650DF10 (Omega Optical).

24) Kit de diagnostic FISH multicolore, caractérisé en ce qu'il comprend
15 les sondes d'ADN selon la revendication 8 et en ce que chaque fluorophore de longueur d'onde d'absorption et d'émission spécifique est couplé à un filtre optique de longueur d'onde d'émission spécifique et à un filtre optique d'excitation spécifique, caractérisées en ce que :

20 a) le fluorophore FITC ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 494 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 517 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 490DF30 (Omega Optical) et à l'émission de type 530DF30 (Omega Optical),

b) le fluorophore Cy3 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 554 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 568 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 546DF10 (Omega Optical) et à l'émission de type 570DF10 (Omega Optical),

25 c) le fluorophore TR ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 593 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 613 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 590DF10 (Omega Optical) et à l'émission de type 615DF10 (Omega Optical),

30 d) le fluorophore Cy5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 652 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 670 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 650DF20 (Omega Optical) et à l'émission de type 670DF10 (Omega Optical),

- e) le fluorophore Cy7 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 743 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 767 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 740DF25 et à l'émission de type 780EFLP,
- 5 f) le fluorophore Cy5,5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 675 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 694 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 680DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 700EFLP (Omega Optical),
-
- 10 g) le fluorophore Bodipy 630/650 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 632 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 658 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 630DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 650DF10 (Omega Optical).



1971

1

2

3